



11

# Offenlegungsschrift 29 15 082

21

Aktenzeichen: P 29 15 082.1

22

Anmeldetag: 12. 4. 79

43

Offenlegungstag: 31. 10. 79

30

Unionspriorität:

32 33 31

13. 4. 78 Frankreich 7810975

54

Bezeichnung:

Verfahren und Reagenzsatz zum Nachweis und zur Charakterisierung von Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

71

Anmelder:

Institut Pasteur, Paris

74

Vertreter:

Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Vossius, D., Dipl.-Chem.;  
Hiltl, E., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr. rer. nat.;  
Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr. rer. nat.; Pat.-Anwälte, 8000 München

72

Erfinder:

Kourilsky, Philippe; Avrameas, Stratis; Cami geb. Contamine, Brigitte;  
Guesdon, Jean-Luc; Paris

5

u.Z.: P 108 (DV/nk/ke)

Case: PL-0053 79 05

12. April 1979

Institut Pasteur

10 Paris, Frankreich

---

Verfahren und Reagenzsatz zum Nachweis und zur Charakterisierung  
von Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

15

---

Priorität: 13. April 1978, Frankreich, Nr. 78 10975

---

20

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz oder eines bestimmten Nukleinsäure-Fragments, insbesondere eines Gens, auch der gesamten Nukleinsäure in einer Probe eines Nukleinsäurekomplexes durch Zusammenbringen der Probe, gegebenenfalls nach vorherigen Denaturieren der untersuchten Nukleinsäure, mit einem komplementäre Nukleinsäure enthaltenden Indikator, der hybridisierbar mit der gesuchten Nukleinsäure oder deren Sequenz ist, dadurch gekennzeichnet, daß man als Indikator einen durch Bindung an ein Enzym vor oder nach der Hybridisierungsreaktion chemisch modifizierten Indikator verwendet wobei die gegebenenfalls anwesende Nukleinsäure oder deren Sequenz durch die Aktivität des so umgewandelten Hybridisierungsprodukts aus Indikator und Nukleinsäure oder deren Sequenz als Substrat für ein Enzym nachgewiesen werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

- 1 man das Enzym im Hinblick auf seine Fähigkeit, auf ein far-  
biges Substrat einzuwirken, auswählt, und daß man die Umwand-  
lungsrate des Substrats, die dem Anteil der gesuchten Nuklein-  
säure oder deren Sequenz in der Ausgangsprobe korrelierbar ist,  
5 durch optische oder analoge Analyse bestimmt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,  
daß man den Indikator durch eine chemische Gruppe modifiziert,  
die mit dem Enzym oder einem Molekül, das stabil mit dem Enzym  
10 verbunden ist, einen stabilen Komplex bilden kann.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß  
man sowohl als chemische Gruppe als auch als Molekül Biotin  
oder Avidin verwendet.

15

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß  
man als Enzym die  $\beta$ -Galactosidase verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet,  
20 daß man zunächst die Hybridisierung, dann die Bindung zwischen  
dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und  
dem Enzym durchführt und anschließend den gegebenenfalls im  
Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator abtrennt  
bzw. abbaut.

25

7. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet,  
daß man zunächst die Hybridisierung und anschließend nach Ab-  
trennung bzw. Abbau des gegebenenfalls im Überschuß vorhan-  
denen nicht hybridisierten Indikators die Bindung zwischen  
30 dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und  
dem Enzym durchführt.

8. Reagenzatz zur Durchführung des Verfahrens gemäß Ansprüche 1 bis  
7, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Bestandteile aufweist:

- 35 a) mindestens einen bestimmten Indikator aus einer RNA oder  
einer einzelsträngigen DNA, die charakteristisch ist für  
eine gesuchte Nukleinsäure oder deren Sequenz, wobei  
dieser Indikator im Hinblick auf seine Bindung mit einem

- 1 Enzym chemisch modifiziert ist,
- b) das gegebenenfalls modifizierte Enzym, das für die  
Bindung mit dem Indikator verwendet wird,
- 5 c) ein insbesondere farbiges Substrat, das für das Enzym  
spezifisch ist,
- d) Reagentien, die für die Zellyse, insbesondere bei der  
10 Untersuchung von Blut, und für die Extraktion von Nuk-  
leinsäuren erforderlich sind.
9. Reagenzsatz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß  
der Indikator aus einer RNA an Biotin gebunden ist und daß das  
15 Kupplungsprodukt aus Avidin und einem Enzym die  $\beta$ -Galactosida-  
se als Enzym enthält.
10. Komplex aus einem Enzym, das insbesondere durch  
20 seine Fähigkeit mit einem farbigen Substrat zu reagieren nach-  
weisbar ist, und einem RNA- oder DNA-Indikator, wobei die Bin-  
dung direkt oder mittels eines komplexbildenden Mittels erfolgt.
11. Komplex aus einem Enzym, das insbesondere durch seine  
25 Fähigkeit mit einem farbigen Substrat zu reagieren nachweis-  
bar ist, und mindestens einem chemischen Molekül, wobei der  
ganze Komplex an einen gegebenenfalls modifizierten RNA- oder  
DNA-Indikator gebunden werden kann.
- 30 12. Komplex nach Anspruch 11 enthaltend  $\beta$ -Galactosidase als  
Enzym und Avidin oder Biotin als chemische Substanz.

1

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und gegebenenfalls zur Charakterisierung einer Nukleinsäure oder einer Sequenz derselben, in einer diese möglicherweise enthaltenden Probe. Sie betrifft ferner die zur Durchführung des Verfahrens erforderlichen Reagenzien und schließlich die Verwendung eines solchen Verfahrens, beispielsweise zur raschen Diagnostizierung in vitro, ob in einer biologischen Probe menschlicher oder tierischer Herkunft bestimmte Nukleinsäurepartikel etwa infektiösen Charakters vorhanden sind oder ob ein bestimmtes Gen aus dem normalen Erbgut des Wirts unverändert ist oder nicht.

Jede biologische Probe, beispielsweise Blut, das jedem Lebewesen entnommen werden kann, enthält verschiedene Nukleinsäuren in außerordentlicher Reichhaltigkeit. Dies trifft auch für verschiedene Sequenzen zu, beispielsweise zahlreiche Gene, die jede einzelne Nukleinsäure in diesen Proben enthalten kann. Daher kann der Genetiker auf große Schwierigkeiten beim Aufspüren oder bei der Charakterisierung von bestimmten Nukleinsäuren in einer Probe stoßen. Die Schwierigkeiten werden noch größer, wenn es darum geht, die Anwesenheit bestimmter Fragmente, beispielsweise der in diesen Nukleinsäuren enthaltenen Gene, zu charakterisieren.

Um eine einzelne Nukleinsäure oder einzelne Gene - beispielsweise im Hinblick auf Studien der Organisation genetischer Sequenzen der DNA, in der sie enthalten sind - zu charakterisieren, benötigt man zunächst eine mit dieser Nukleinsäure angereicherte, aus der untersuchten Probe erhaltene Fraktion. Zu diesem Zweck wurden bereits Anreicherungsverfahren vorgeschlagen, die sich die Hybridisierungsreaktionen zwischen der gesuchten Nukleinsäure bzw. dem Gen und einem Indikator zunutze machen, sofern ein solcher Indikator verfügbar ist und

- 1 die erhaltenen Hybride sodann von der Probe abgetrennt werden können, beispielsweise durch differentielle Sedimentation aus einer Lösung mittels Ultrazentrifugieren.
- 5 Solche Indikatoren wurden bereits beschrieben: es handelt sich dabei im allgemeinen um Ribonukleinsäuren (RNA), beispielsweise solche, die mittels genetischer Transkription von Strukturgenen erhalten wurden. Die Strukturgene sind Bestandteile der DNA der einzelnen Zellorganismen, aus denen sie stammen. Die DNA ist demnach geeignet, ihrerseits in die Proteine, für welche die Strukturgene codieren, "übersetzt" zu werden. Es ist bekannt, daß die RNA-Nukleotid-Sequenzen zu der Sequenz der DNA, von der sie abstammen, komplementär sind. Dies zeigt sich in der Eigenschaft der RNA, gemischte Hybride mit den entsprechenden Sequenzen der zugehörigen DNA zu bilden, die zuvor denaturiert worden ist, soweit diese anfangs doppelsträngig war, beispielsweise nach Inkubation bei hoher Ionenstärke und erhöhter Temperatur oder in basischem Milieu.
- 15
- 20 Es wurde vorgeschlagen, den Nachweis von gebildeten Hybriden mit Hilfe einer radioaktiven Markierung der Gene selbst oder der RNA-Indikatoren vorzunehmen. Die Durchführung dieser Methoden ist jedoch nicht einfach, und außerdem ist es dabei nicht immer möglich, die Gene innerhalb der DNA ausreichend
- 25 zu lokalisieren.

Um die untersuchten Gene in der sie enthaltenden DNA besser lokalisieren zu können und eine Methode zur Bildung von mit bestimmten DNA-Segmenten angereicherten Fraktionen - ausgehend von derselben DNA - zu entwickeln, haben Manning et al eine Methode zum physiko-chemischen Nachweis dieser Gene vorgeschlagen. Diese Methode besteht aus der chemischen Modifizierung des RNA-Indikators durch Anheftung von Biotingruppen, d.h. Derivaten des Cytochrom C. Diese Biotingruppen heften sich durch Brückenbildung bei der Hybridisierung an die DNA an und sind nun physikalisch im Elektronenmikroskop als Staubteilchen, die aus submikroskopischen Kügelchen von

30

35

- 1 einem Durchmesser von 60 nm bestehen, insbesondere auf einem  
 Untergrund von Polymethacrylsäureester nachweisbar. Die Kügelchen wurden  
 zuvor chemisch modifiziert und kovalent an Avidin-Moleküle gebunden.  
 Diese Methode ist in "A New Method of in situ Hybridization",  
 5 Chromosoma, Springer Verlag (Berlin), Bd. 53 (1975), S. 107  
 bis 117 und in "A Method for Gene Enrichment Based on the  
 Avidin-Biotin Interaction, Application to the Drosophila  
 Ribosomal RNA Genes", Biochemistry, Bd. 16 (1977), Nr. 7,  
 S. 1364 - 1369 beschrieben.

10

- Die Inkubation der Hybride, die durch Biotin und Avidin modi-  
 fiziert sind, macht es möglich, die Stelle der gesuchten Gene  
 in der sie enthaltenden DNA zu "markieren" und sie innerhalb  
 der globulären Struktur der DNA nachzuweisen. Diese ist ebenfalls  
 15 im Elektronenmikroskop sichtbar infolge der sehr starken  
 nicht kovalenten Interaktionen, die nach wie vor an den Stellen  
 herrschen, die frei von Biotin und Avidin geblieben sind.

- Diese Methode ist jedoch kaum dazu geeignet,  
 20 rasch zu bestimmen, ob derartige Gene bzw. DNA in einer biologischen  
 Probe menschlicher oder tierischer Herkunft anwesend sind oder  
 nicht. So ist beispielsweise eine rasche Diagnose einer In-  
 fektion, von welcher der Wirt möglicherweise befallen ist, oder  
 der Tatsache, ob ein Gen oder beispielsweise eine DNA-Sequenz  
 25 in diesem Wirt unverändert geblieben ist oder nicht nach der  
 Methode schwer möglich.  
 Aufgabe der Erfindung ist es Nachweis- und sogar Charakterisie-  
 rungsmethoden zur Verfügung zu stellen, die mit einfachen Mit-  
 teln von Laboranten ohne besondere Ausbildung angewandt werden können.  
 30 Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Die Erfindung betrifft somit den in den Patentansprüchen gekenn-  
 zeichneten Gegenstand.

- 35 Natürlich darf die chemische Modifizierung die gegebenenfalls  
 zusätzlich stattfindende Hybridisierung des Indikators mit der ge-  
 suchten DNA-Sequenz bzw. dem DNA-Fragment nicht behindern.

- 1 Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß mit dieser Methode die Möglichkeit gegeben ist, rasch festzustellen, ob in einer biologischen Probe das DNA-Gen bzw. DNA-Fragment, das dem verwendeten Indikator entspricht, vorhanden ist oder nicht, und
- 5 dies sogar bei Anwesenheit einer großen Anzahl anderer Nukleinsäuren. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, daß durch den Nachweis aufgrund der enzymatischen Aktivität, wobei das Enzym durch das Substrat an das Hybrid gebunden ist, umfassende Anwendungsmöglichkeiten gegeben sind.
- 10 Nach einer ausreichenden Reinigung des Hybrids ist es sogar möglich, Angaben über die Konzentration der gesuchten DNA in der untersuchten biologischen Probe bzw. über die Anzahl der Kopien des gesuchten Gens in der gereinigten DNA zu erhalten, und zwar durch Bestimmung der Enzymaktivität.
- 15 Bei einer zu untersuchenden Nukleinsäureprobe kann man zunächst die Hybridisierung durchführen. Dann kann die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym stattfinden. Man kann vor Bestimmung der
- 20 Enzymaktivität den gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator bzw. das Überschüssige mit dem Indikator nicht umgesetzte Enzym abtrennen oder abbauen.
- Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Ab-
- 25 trennung oder der Abbau des überschüssigen nicht hybridisierten Indikators gegebenenfalls vor der Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym erfolgen.
- 30 Der spezifische Indikator kann aus RNA oder einzelsträngiger DNA bestehen. Verwendet man eine ursprünglich doppelsträngige DNA (oder RNA) als Indikator, so muß er vorher durch an sich bekannte Methoden denaturiert worden sein.
- 35 Führt man eine chemische Modifizierung des Indikators mit Biotin durch, so kann man die Methode nach Manning et al (a.a.O.)



- 1 mittels des Cytochrom C (durchschnittlich ein Molekül Biotin pro etwa 100 Nukleotide) anwenden.

Vorzugsweise verwendet man zum Markieren des Hybrids durch  
5 das Enzym den Komplex<sup>(Kupplungsprodukt)</sup>, der sich nach der Methode von Avrameas (beschrieben in Immunochemistry, Bd. 6 (1969), S. 43 - 52) aus Avidin und dem Enzym, insbesondere der  $\beta$ -Galactosidase, ergibt.

Man kann natürlich auch andere chemische Modifizierungsmethoden  
10 für den Indikator und gegebenenfalls das Enzym im Hinblick auf deren Bindung, vorzugsweise nach der Hybridisierungsreaktion, verwenden und kann die modifizierenden Mittel für Indikator und Enzym umgekehrt verwenden.

15 Es kommen noch andere Paare von modifizierenden Mitteln für Indikator und Enzym in Frage, für die nachstehend einige Beispiele angegeben sind. Das erste dieser Mittel wird vorzugsweise jeweils zur chemischen Modifizierung des Indikators und das zweite zur chemischen Modifizierung des Enzyms eingesetzt.

20 Der Indikator kann beispielsweise nach einer bekannten Methode durch Metallionen, wie Quecksilberionen, modifiziert werden, und der Nachweis wird mittels eines Enzyms durchgeführt, das Sulfhydrylgruppen (-SH) aufweist oder an einen solche Gruppen enthaltenden Träger gebunden ist.

25

Man kann beispielsweise folgendermaßen vorgehen, wenn die zu untersuchende Probe nur aus wenigen Millilitern Blut besteht: Die Erythrocyten werden lysiert, und die DNA wird nach üblichen Methoden extrahiert. Sodann wird eine kleine Menge der erhaltenen DNA, beispielsweise 1 bis 100  $\mu$ g, mit 0,1 - 0,3 N NaOH denaturiert, die Lösung anschließend neutralisiert und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit dem der gesuchten DNA oder dem DNA-Fragment entsprechenden Indikator versetzt, und zwar etwa  
35 1  $\mu$ g Indikator pro 100  $\mu$ g denaturierte DNA (die Menge der gebrauchten NaOH richtet sich nach dem Anteil der gesuchten DNA in der zu analysierenden

1 Probe). Die Lösung wird sodann mit Salzen versetzt, um ein  
hohes Ionenmilieu zu erreichen, nämlich mit mindestens 0,3  
in Gegenwart von 50 % Formamid und eines Chelatbildners in ge-  
ringer Konzentration. Das Volumen soll vorzugsweise gering sein.  
5 Die Hybridisierung kann sodann bei der hierfür üblichen Tempe-  
ratur 1 bis 40 Stunden (normalerweise 16 Stunden) durchgeführt  
werden. Man kann auch die Methode nach Manning (a.a.O.) oder  
andere Hybridisierungsmethoden anwenden, beispielsweise die  
Methode nach Kohne et al (Biochemistry, Bd. 16 (1977), S. 5329  
10 - 5341), die bei der hierfür üblichen Temperatur in einer phenol-  
haltigen Emulsion durchgeführt wird.

Anschließend wird an ein Enzym, beispielsweise die  $\beta$ -Galactosi-  
dase, gebundenes Avidin zugesetzt, und zwar unter Bedingungen,  
welche die Bindung des Biotins am Indikator an die freien Grup-  
15 pen des Avidins des Komplexes ermöglichen.

Der nicht hybridisierte Indikator wird anschließend vom hyb-  
ridisierten Indikator nach üblichen Methoden abgetrennt, bei-  
spielsweise durch Ausfällen mit Polyäthylenglykol, Gelchromato-  
graphie beispielsweise mit Sepharose, oder Ultrazentrifugi ren.

20 Andererseits kann der nicht hybridisierte Indikator vor der  
Bindung des Avidins, welches das Enzym mit den an den hybri-  
disierten Indikator gebundenen Biotingruppen trägt, an die DNA  
abgetrennt werden.

Man kann das gegebenenfalls fixierte Enzym und dementsprechend  
25 die gegebenenfalls stattfindende effektive Hybridisierung des Indikators mit  
der untersuchten DNA nachweisen, indem man ein Enzymsubstrat, insbesondere  
Orthonitrophenolgalactosid (ONPG), mit der Lösung in Berührung bringt.

Sobald die Versuchsbedingungen festgelegt sind, ist es natürlich  
30 möglich, eine meßbare Aktivitätsschwelle zu bestimmen, beispiels-  
weise durch eine kolorimetrische oder fluorographische Methode.  
Oberhalb dieser Schwelle kann auf die Anwesenheit der gesuchten  
DNA oder des DNA-Fragments in der behandelten Probe geschlossen  
werden.

35

Das nachstehend beschriebene im Labor durchgeführte Versuchsbei-

- 1 spiel dient zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.  
Es liegt im Rahmen des handwerklichen Könnens, die Methoden  
im Hinblick auf die untersuchte biologische Probe und die ge-  
suchte DNA oder das DNA-Fragment entsprechend abzuwandeln.

5

### Versuchsbeispiel

- Der Versuch dient dem Nachweis einer Maus-DNA durch Hybri-  
disierung dieser DNA mit ribosomaler Maus-RNA als Indikator.  
100 µg Maus-DNA pro 100 µl wäßrige Lösung werden durch Ver-  
10 setzen mit 10 µl 1 M NaOH denaturiert. Nach 10 Minuten wird  
die Lösung mit 10 µl 1,5 M Natriumphosphorsäure ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ver-  
setzt und auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Die dena-  
turierte DNA-Lösung wird sodann mit 1 µg. ribosomaler RNA, die  
mit Biotin mittels Cytochrom C (hergestellt nach der Methode  
15 von Manning et al.) markiert ist, versetzt. Das Volumen wird  
mit Wasser auf 160 µl gebracht. Dann werden 40 µl einer Mine-  
ralsalzlösung in einer Konzentration von 20 x SSC (Standard  
Saline Citrate) und 200 µl redestilliertes oder deionisiertes  
Formamid zugegeben. Die Lösung 1 x SSC ist eine wäßrige Lösung  
20 von 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat, bei einem pH-Wert von  
7,0. Das Gemisch wird 16 Stunden bei üblicher Temperatur in-  
kubiert, dann bei 4°C gegen 2 x SSC dialysiert und anschließend  
8 Stunden gegen 500 ml Pufferlösung, die 0,1 M Phosphat, 1 M  
NaCl und 0,01 M Äthylendiamintetraessigsäures Natrium (EDTA) enthält,  
25 bei einem pH-Wert von 7,0 dialysiert. Letztere Dialyse wird  
zweimal wiederholt und je 8 Stunden durchgeführt. Die erhalte-  
ne Lösung wird eine Stunde bei üblicher Temperatur mit pank-  
reatischer Ribonuclease inkubiert. Die Ribonuclease-Konzen-  
tration beträgt 10 µg/ml. Durch diese Behandlung kann nicht  
30 hybridisierte RNA abgebaut werden.  
Sodann werden 1 mg/ml Cytochrom C-Lösung und 1 µl einer Lösung,  
die in 1 mg/ml Avidin und 2 mg/ml β-Galactosidase enthält, zu-  
gegeben. Dabei erweist sich, daß eines von 7 Molekülen β-Ga-  
lactosidase an Avidin gebunden ist. Die Lösung wird gerührt  
35 und sodann 4 Stunden bei 4°C stehengelassen.  
Anschließend wird mit Phosphat-Dialysepuffer auf 10 ml ver-  
dünnt, und die erhaltene Lösung wird eine Stunde bei 35 000

1 U/Min. zentrifugiert (im Beckman Rotor SW 41). DNA- und RNA-Hybride  
finden sich im Niederschlag zusammen mit den an die RNA ge-  
bundenen Avidin- $\beta$ -Galactosidase-Komplexen. Der Überstand ent-  
hält nicht hybridisierte und durch Ribonuclease abgebaute RNA sowie  
5 ungebundene Avidin und  $\beta$ -Galactosidase.

Der Niederschlag wird abgetrennt und erneut in 10 ml Pufferlösung  
suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wird der Nieder-  
schlag in 0,5 ml Puffer aufgenommen (Tube Nr. 1). Sodann wird  
die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase beim Umsetzen des Substrats  
10 ONPG nach der Methode von Miller (Experiments in bacterial gene-  
tics (1972), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,  
New York, USA) durch Messung der optischen Dichte der  
Lösung bei 420 m $\mu$  bestimmt, und zwar nach mindestens 30-minü-  
tiger Inkubation bei 37°C. Es werden unter genauer Einhaltung  
15 der vorgenannten Bedingungen Kontrollproben hergestellt, wobei  
jedoch beim ersten Kontrollversuch die Zugabe der ribosomalen  
RNA (Tube Nr. 2) und beim zweiten Kontrollversuch die Zugabe  
der Maus-DNA (Tube Nr. 3) weggelassen wird. Die Ergebnisse  
sind in der Tabelle zusammengefaßt.

20

Tube Nr.	<u>Tabelle</u>		optische Dichte bei 420 m $\mu$ , nach 30 Min., bei 37°C
	Inhalt DNA	RNA	
25			
		*	
1	+	+	0,45
2	+	-	0,14
3	-	+	0,15

30

\*  
+ und - in der DNA- und RNA-Spalte deuten jeweils an, ob die  
DNA bzw. RNA in der ursprünglichen Lösung vorhanden war oder  
nicht.

35 Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die in der (das Hybrid  
enthaltenden) Tube Nr. 1 gemessene optische Dichte signifi-  
kant höher ist als bei den Kontrollproben.

L

- 1 Das Versuchsbeispiel erläutert also die Bedingungen, unter denen die gegebenenfalls anwesende DNA bzw. das DNA-Fragment nachgewiesen werden kann, sofern ein komplementärer Indikator dieser DNA bzw. des DNA-Fragments verfügbar ist, und zwar  
5 durch eine einfache Methode, die weder kompliziertes Labormaterial noch besonders große fachmännische Erfahrung erfordert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann bei diagnostischen in vitro-Verfahren zum Nachweis verschiedener Viren, wie Herpes,  
10 Epstein Barr, Pox-Virus, Cytomegalo, in biologischen Proben (wie Blutproben, Stuhlproben) besonders vorteilhaft angewandt werden. Es kann ferner für die Diagnose bestimmter chromosomaler Anomalien angewandt werden.

- 15 Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiterhin zur Feststellung der bakteriellen Diagnose, insbesondere bei Trägern pathogener Gene, seien sie exprimiert, nicht exprimiert oder latent, angewandt werden.

- 20 Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß man beim Suchen einer infektiösen DNA rasch auf den Erkrankungsgrad einer erfindungsgemäß behandelten biologischen Probe im Hinblick auf die gesuchte Nukleinsäure bzw. deren Fragmente schließen kann, wenn keine Induzierung oder zumindest keine Überschreitung der  
25 Aktivitätsschwelle auf dem farbigen Substrat festgestellt wird, sei es durch Versuche sei es durch Vergleich mit den virusfreien Kontrollproben.

- Umgekehrt kann die festgestellte nicht vorhandene Aktivität  
30 hinsichtlich des farbigen Substrats, insbesondere oberhalb der vorgenannten Schwelle, in einem anderen bereits angesprochenen Bereich Anwendung finden: Sie kann die Anwesenheit einer Anomalie gesuchter chromosomaler Abnormität durch die festgestellte nicht vorhandene gesamte oder partielle Hybridisierung zwischen  
35 Indikator und untersuchter DNA anzeigen.

Beispielsweise kann man für medizinische Labors

1            R agenzsätze ("Kit") mit allen zur Durchführung des  
erfindungsgemäßen Verfahrens notwendigen Reagentien zur Ver-  
fügung stellen.            Solche Reagenzsätze können insbesondere  
Muster für Indikatoren enthalten, die beispielsweise den DNA von  
5 gut erforschten pathogenen Viren oder Bakterien entsprechen, und  
sogar für Indikatoren, die den besonderen Genen entsprechen, die  
normalerweise in biologischen zu untersuchenden Proben wie Blut  
enthalten sind.

10 Wie bereits erwähnt, sollte der modifizierte Indikator vorzugs-  
weise ein Indikator sein, an den Biotin gebunden ist und wobei  
das modifizierte Enzym, beispielsweise die  $\beta$ -Galactosidase,  
selbst an das Avidin gebunden ist.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin        neue  
Komplexe aus einem Enzym (dessen Aktivität im Hinblick auf  
insbesondere ein farbiges Substrat nachgewiesen werden kann)  
und einem Indikator (RNA oder einzelsträngige DNA), sei es die  
Bindung erfolgt direkt, sei es mit Hilfe eines komplexbildenden Mittels  
20 zur industriellen Verwendung. Sie betrifft auch den Komplex aus Enzym und  
mindestens einem chemischen Molekül, wobei der ganze Komplex an einen ge-  
gebenenfalls modifizierten Indikator (RNA oder DNA) gebunden  
werden kann, der selbst mit einer DNA bzw. einem DNA-Fragment hybri-  
disierbar ist. Solche neue industrielle Produkte sind bei-  
25 spielsweise die Komplexe aus Indikator (RNA oder DNA) und einem  
Enzym,        wie die             $\beta$ -Galactosidase, oder die Komplexe  
aus Avidin bzw. Biotin und einem solchen Enzym.

Die Erfindung kann noch in anderen Bereichen Anwendung finden,  
30 insbesondere bei der Markierung bestimmter DNA-Fragmente in  
bekannten genetischen Versuchen zur Bestimmung des Genotyps  
der in Frage stehenden DNA. Sie kann insbesondere Anwendung  
finden bei der Bestimmung, ob ein besonderes DNA-Fragment in  
genetischen Ausleseversuchen inkorporiert ist oder nicht. Bei  
35 diesen Ausleseversuchen geht es beispielsweise um Transforma-  
tionen von Zellen mittels fremder DNA, die das betreffende DNA-  
Fragment enthält, oder aber um Transduktionsversuche, bei denen

1 DNA-Fragmente, die normalerweise in der zellulären DNA enthalten sind, in die virale DNA übergehen, mit der die Zellen infiziert worden sind. Eine solche Anwendung ist natürlich nur möglich, wenn man über einen Indikator verfügt, der das kom-  
5 plementäre RNA- bzw. DNA-Fragment des Fragments der gesuchten Nukleinsäure ist.

Die vorliegende Erfindung erschöpft sich keineswegs in den erläuterten Anwendungs- und Durchführungsmöglichkeiten. Sie um-  
10 faßt vielmehr alle Varianten, insbesondere hinsichtlich Modifizierungen des Indikators, die eine enzymatische Dosierung des Hybrids ermöglichen, sowie die Modifizierungen hinsichtlich der Bildung und/oder Reinigung des Hybrids, der Markierung oder chemischen Modifizierung der untersuchten DNA selbst, und zwar  
15 unter den vorgenannten Bedingungen, wobei beim RNA-Indikator keine besondere Markierung vorgenommen wird. Eine Umkehrung der Reagentien kann beispielsweise im Falle einer DNA in Betracht gezogen werden, die zahlreiche repetitive Gene enthält, welche aus der gesamten DNA in Form des Hybrids mit dem Indikator iso-  
20 liert werden sollen. Vorher wird die DNA durch übliche Methoden fragmentiert.

25

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann man das Verfahren zum Nachweis des Hybrids aus der gesuchten DNA und dem Indikator, mittels eines an ein Enzym, beispielsweise die  $\beta$ -Galactosidase, gebundenen Antihybrid-Antikörpers anwenden.

30

35

1/5/1 (Item 1 from file: 350)  
 DIALOG(R)File 350:Derwent World Pat.  
 (c) 1994 Derwent Publ Ltd. All rts. reserv.

002277962 WPI Acc No: 79-77171B/43

XRAM Acc No: C79-B77171

Identification of nucleic acid fragments - by coupling with a complementary nucleic acid to liberate a bound enzyme, used e.g. for diagnosing infections

Patent Assignee: (INSP ) INST PASTEUR; (ANVR ) AGENCE NAT VALORISA

Number of Patents: 012

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week	
BE 875598	A	791015	7943	(Basic)
NL 7902911	A	791016	7944	
GB 2019408	A	791031	7944	
• DE 2915082	A	791031	7945	
JP 54143297	A	791108	7951	
FR 2422956	A	791214	8005	
GB 2019408	B	820818	8233	
CH 647870	A	850215	8512	
US 4581333	A	860408	8617	
IT 1119725	B	860310	8728	
DE 2915082	C	890713	8928	
JP 91064119	B	911003	9144	

Priority Data (CC No Date): FR 7810975 (780413)

Abstract (Basic): The presence of a specific sequence or fragment or a nucleic acid, esp. a gene, is detected by contacting the sample of the nucleic acid, opt. after denaturing, with a probe comprising a complementary nucleic acid capable of hybridising with the sequence of nucleic acid sought, this complementary nucleic acid being coupled, before or after the hybridisation reaction, with an enzyme. The presence of the specific sequence or fragment is revealed on a substrate for the enzyme. The enzyme pref. acts chromogenically on the substrate so that optical analysis reveals its presence. A typical nzyme is beta-galactosidase.

The process may be effected without expensive equipment by laboratory staff of limited experience.

File Segment: CPI; EPI

Derwent Class: B04; D16; J04; S03; S05; R16;

Int Pat Class: G01N-000/00; C12K-001/02; G01N-033/16; C07G-007/02;

C07H-021/00; G01N-031/14; C12N-009/00; C12Q-001/00; C12Q-001/68

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C; B04-B04A; B12-K04; D05-A02; J04-B01

Chemical Fragment Codes (M1):

01\* V800 V751 V752 V753 V754 V600 V641 E720 J171 J521 N100 M430 M740

M750 P831 P832 M782 R000 M423 M902

Ring Index Numbers: 00945



# United States Patent [19]

Kourilsky et al.

[11] Patent Number: 4,581,333

[45] Date of Patent: Apr. 8, 1986

[54] METHOD OF DETECTING AND CHARACTERIZING A NUCLEIC ACID OR REACTANT FOR THE APPLICATION OF THIS METHOD

[75] Inventors: Philippe Kourilsky; Stratis Avrameas; Brigitte Cami nee Contamine; Jean-Luc Guesdon, all of Paris, France

[73] Assignee: Institut Pasteur, Paris, France

[21] Appl. No.: 373,017

[22] Filed: Apr. 29, 1982

## Related U.S. Application Data

[63] Continuation of Ser. No. 169,370, Jul. 16, 1980, abandoned, which is a continuation of Ser. No. 29,375, Apr. 13, 1979, abandoned.

## [30] Foreign Application Priority Data

Apr. 13, 1978 [FR] France ..... 78 10975

[51] Int. Cl.<sup>4</sup> ..... C12Q 1/68; C12Q 1/34; G01N 33/54; C12N 9/96

[52] U.S. Cl. .... 435/6; 435/7; 435/188; 435/18; 435/810

[58] Field of Search ..... 435/6, 7, 172, 188, 435/805, 810, 176, 177, 5, 18

## [56] References Cited

### U.S. PATENT DOCUMENTS

4,002,532 1/1977 Weitman et al. .... 435/188  
4,067,774 1/1978 Rubenstein et al. .... 435/7  
4,228,237 10/1980 Hevey et al. .... 435/188  
4,318,980 3/1982 Boguslaski et al. .... 435/188

### OTHER PUBLICATIONS

Manning et al., *Biochemistry*, 16(7):1364-1370 (1977).  
Noyes et al., *Cell*, 5:301-310 (1975).  
Reiser et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 85(3):1104-1112 (1978).  
Wetmur, *Biopolymers*, 14:2517-2524 (1975).  
Manning et al., *Chromosoma (Berl.)*, 53:107-117 (1975).

• *Primary Examiner*—Esther M. Kepplinger  
*Attorney, Agent, or Firm*—Weiser & Stapler

## [57] ABSTRACT

Method for detecting the possible presence of a DNA fragment, notably of a gene, in the midst of a complex sample of nucleic acids.

It comprises the hybridization of the sought fragment with a RNA probe, this being, prior or subsequent to the hybridization reaction, modified by an enzyme.

Application to seeking of particular genes or DNA fragments in the midst of a biological sample.

32 Claims, No Drawings